

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Der Einfluß verschiedener Pharmaka
auf die Aggregation von Albuminmolekülen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Wilhelm Dopjans
aus Osnabrück

1974

Mainz 1973

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluß verschiedener Pharmaka
auf die Aggregation von Albuminmolekülen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Den Medizinischen Fachbereichen vorgelegt von

Wilhelm D o p j a n s
aus Osnabrück
Mainz 1973



Dekan des Fachbereichs 06: Prof. Dr. U. Wollert

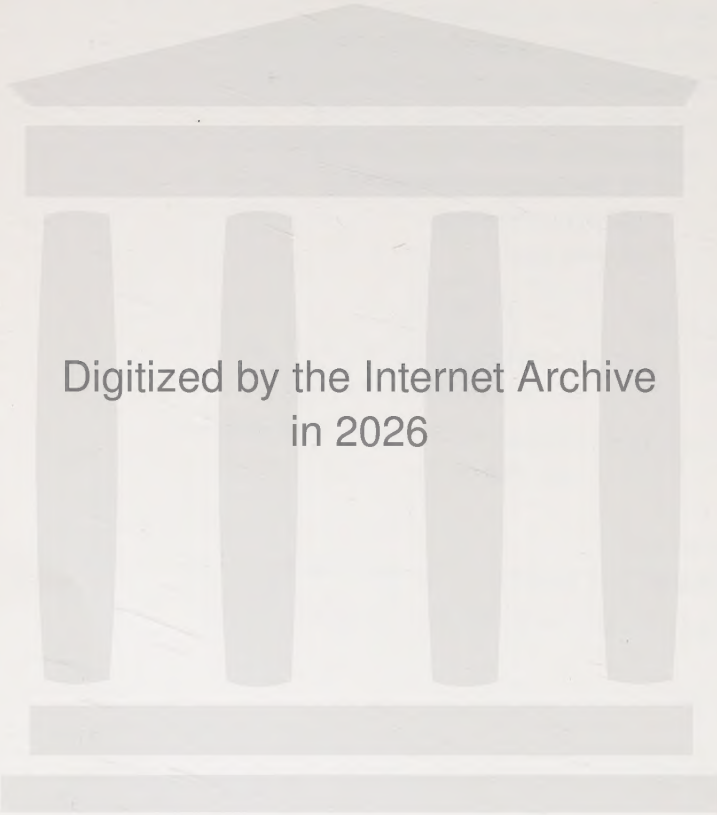
Referent: Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein

Korreferent: Prof. Dr. U. Wollert

21.12.1974

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methodik	
a) Verwendete Substanzen	7
b) Prinzip der Sephadex-Gelfiltration	8
c) Entwicklung der Versuchsanordnung	8
d) Einfluß von Pharmaka auf die Aggregation von Albuminmolekülen	
1) Versuchsvorbereitung	16
2) Durchführung	
3) Messung	
Ergebnisse	
Reihe I: Orientierende Versuche mit verschiedenen Pharmaka	19
Reihe II: Versuche mit vier ausgewähl- ten Pharmaka	19
Statistik	
Reihe I: Einfache Varianzanalyse	22
Reihe II: Student'scher t-Test	22
Diskussion	25
Zusammenfassung	28
Literaturverzeichnis	29
Lebenslauf	33



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554426_0099

Einleitung

Im Organismus werden nach der Resorption Arznei- und Fremdstoffe mehr oder weniger an Plasma- und Gewebsproteine gebunden. Damit besitzen die Eiweißkörper für die Arzneitherapie eine wichtige Transport- und Depotfunktion (Uehleke, 1971; Brodie, 1964; Goldstein, 1949; Bennhold, 1938; siehe auch Abb. 1). Ohne diese Bindungen würden im Besonderen viele wasserlösliche Arzneimittel sehr schnell über die Nieren ausgeschieden und so kurze Verweil- und geringe Wirkungsdauer besitzen. Nur die im Serum ungebunden vorliegenden Moleküle sind pharmakologisch wirksam (Bonnycastle, 1965). Wie hoch der Anteil an freiem Pharmakon ist, das hängt von der Art der Plasmaalbuminbindung des betreffenden Arzneimittels ab (Kriegelstein, 1969).

Die Bindung an Plasma- und Gewebsproteine ist überwiegend reversibel. Der Hauptpartner im Serum ist das Albumin, das auch den größeren Teil der Serumproteine stellt (Goldstein, 1949). Sinkt die freie Konzentration einer Verbindung im Serum ab, so wird wieder eine entsprechende Menge aus der Proteinbindung bis zur Gleichgewichtseinstellung freigegeben. Die gebundenen Moleküle sind also für die Therapie nicht wertlos, sondern sie liegen abrufbereit auf Vorrat. Wenn diese Depots fehlten, so würden die Blut- und Gewebespiegel des freien, wirksamen Arzneimittelanteils außerordentlich stark schwanken und zwischen unwirksamen und toxischen Konzentrationen hin- und herpendeln (Uehleke, 1971).

Wird das gebundene Pharmakon nun z.B. durch ein anderes aus seiner Proteinbindung verdrängt, so steigt die Konzentration des freien Wirkstoffes an. Es kommt zu einer verstärkten Wirkung oder zu toxischen Erscheinungen wie bei Überdosierungen. Dabei kann jedoch

die Wirkungsdauer durch eine geringere Verweildauer im Organismus verkürzt sein. Ein solcher möglicher Verdrängungsvorgang ist immer dann zu bedenken, wenn entweder Kombinationspräparate gegeben werden sollen oder ein Patient, sei es notwendig oder gewohnheitsmäßig, unter einer Medikation steht und nun wegen einer akuten Zweiterkrankung behandelt werden soll. Daß Arzneimittel oft kombiniert werden, führt Uehleke (1971) in zwei Beispielen an:

- 1) In einem der großen amerikanischen Hospitäler bekamen die Patienten während eines stationären Aufenthaltes durchschnittlich 14 verschiedene Präparate.
- 2) Von 163 neuen, in England im Jahre 1961 eingeführten Pharmaka, waren 113 Kombinationspräparate.

Die Frage, wie sich verschiedene, dem Organismus gleichzeitig zugeführte Arzneimittel gegenseitig beeinflussen, ist also von großer Bedeutung. Die Reaktion auf die Gabe eines zweiten Pharmakons könnte eine Abpufferung des wirksamen Anteils, verstärkte Deponierung oder Freisetzung und Absättigung von Albuminbindungsstellen mit der Folge von erhöhtem freien Wirkanteil sein. Eine zweite Substanz könnte so, ohne nach außen hin in Erscheinung zu treten, als Katalysator die therapeutische Funktion eines ersten Wirkstoffes überhaupt erst ermöglichen.

Neben dieser gegenseitigen Beeinflussung besitzt das Bindungsverhalten des einzelnen Pharmakons am Protein Bedeutung. Für die Verteilung und pharmakologische Wirksamkeit einer Substanz ist der Grad dieser Bindung von Wichtigkeit (Krieglstein, 1969; Anton, 1961; Goldstein, 1949). Eine Änderung der Plasmaproteinbindung eines Arzneimittels kann dessen Wirkungsbeginn, Wirkungsstärke, Stoffwechsel und Ausscheidung variieren (Brodie, 1965; Davis und Wood, 1942; Davis, 1943).

Folgende Faktoren können diesen Bindungsgrad beeinflussen:

- a) Eine Änderung der Eiweißkonzentration kann die Größe des freien Pharmakonanteils beeinflussen. Niedriger Proteingehalt im Serum zieht eine Erhöhung des ungebundenen und damit wirksamen Arzneimittelspiegels nach sich (Scholtan, 1961). Eine Erhöhung der Albuminkonzentration führt zur Verringerung der freien Substanzmenge (Franz et al., 1969).
- b) Bei pathologischen Proteinen mit veränderter Primärstruktur kann deren Bindungsvermögen verringert sein (Scholtan, 1961).
- c) Konkurrenz um Bindungsstellen zweier Pharmaka gleicher Affinität hat eine gegenseitige Verdrängung und damit Erhöhung des freien Anteils zur Folge (Franz et al., 1969; Scholtan, 1961). Kunin (1965) setzte Penicilline aus ihrer Serumproteinbindung durch verschiedene Substanzen frei. Dixon et al. (1965) verdrängten Methotrexat durch Sulfonamide und Salicylate.

Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen Rinder-serumalbumin und verschiedene Pharmaka zeigten, daß der ungebundene Arzneimittelanteil einer Arzneimittel-Albuminlösung durch Zugabe eines weiteren Pharmakon erhöht, erniedrigt oder unverändert gelassen wird (Franz et al., 1969; Jähnchen et al., 1968).

Abbildung 2 zeigt das Modell, das zur Veranschaulichung dieser Vorgänge herangezogen wurde.

Steigende Arzneimittelkonzentration kann zu einer zunehmenden Schwellung und Auffaltung des Albuminmoleküls führen und somit die Zahl der an die Oberfläche gelangten reaktionsfähigen Bindungsstellen vergrößern (Klotz und Ayers, 1953, Klotz et al., 1953). Eine stark gebundene Substanz wirkt auf die Tertiärstruktur des Albumins und damit auf dessen Bindungsvermögen ein (Scholtan, 1964 a, b; Scholtan und Gloxhuber, 1966).

Die Veränderung der Affinität einer Bindungsstelle, die einer bereits abgesättigten benachbart liegt, bestimmt ebenfalls das Bindungsvermögen einer Albuminlösung (Scholtan, 1964 b; Scholtan und Gloxhuber, 1966).

Albuminmoleküle liegen in Lösung zum Teil in oligomerer Form vor, so daß Bindungsstellen für fremde Moleküle verlorengehen, weil sie vom Albumin selbst besetzt werden (Foster, 1960).

Wie sich die Zugabe eines Arzneimittels auf das Aggregationsverhalten des Albuminmoleküls auswirkt, versucht diese Arbeit mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration aufzuzeigen.

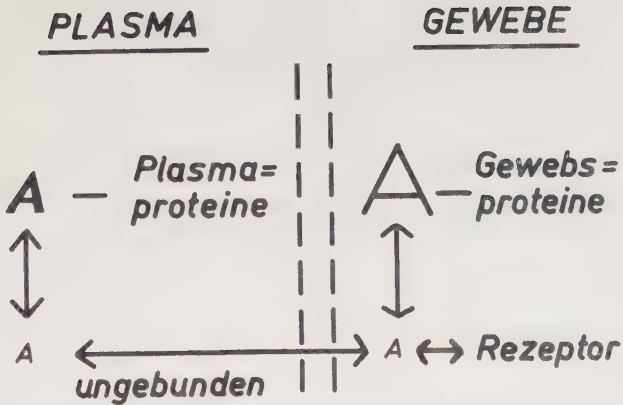


Abbildung 1

Verteilung und Bindung eines Arzneistoffes A in Plasma und Gewebe (nach Uehleke, 1971).
Dicke und Größe der Buchstaben A sollen in etwa die prozentuale Mengenverteilung andeuten.

**Bindungsvermögen einer Albuminlösung
für niedermolekulare Substanzen**

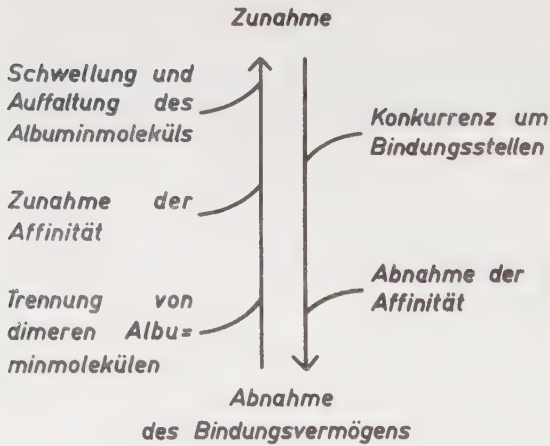


Abbildung 2

Bindungsvermögen einer Albuminlösung für niedermolekulare Substanzen (nach Franz et al., 1969). Einige Faktoren, die das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Arzneimittel beeinflussen können (s. Text).

Methodik

a) Verwendete Substanzen

Der Einfluß folgender Arzneimittel auf das Gleichgewicht zwischen oligomeren und monomeren Bestandteilen einer Albuminlösung wurde untersucht:

Acetazolamid	(Diamox, Lederle Arzneimittel)
Acetylsalicylsäure	(Aspirin, Bayer AG)
Chlortetracyclin	(Aureomycin, Lederle Arzneim.)
Dicloxacillin	(Dichlorstapenor, Bayer AG)
Indomethacin	(Amuno, Sharp und Dohme)
Iloglycamid	(Bilivistan, Dt. Hoffmann-LaRoche)
Methotrexat	(Lederle Arzneimittel)
Phenprocoumon	(Marcumar, Dt. Hoffmann-LaRoche)
Phenylbutazon	(Butazolidin, Dr. Karl Thomae)
Sulfadimethoxin	(Madribon, Dt. Hoffmann-LaRoche)
Suramin	(Germanin, Bayer AG)

Als Albumin wurde Serumalbumin vom Rind (trocken, "reinst", Behringwerke AG) verwendet. Als Lösungs- und Elutionsmittel diente anfangs Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,40, mit 0,02 % Natriumazid, um ein mögliches mikrobielles Wachstum im Sephadex-Gel einzudämmen. Bei der weitaus größeren Zahl der Versuche wurde 0,2 M Tris-Puffer nach Gomori, pH 7,40, mit 0,02 % Natriumazid benutzt. Einige Orientierungsversuche wurden mit Phosphatpuffer bei pH 6,0 und mit Tris-Puffer bei pH 8,0 durchgeführt. Zur Gelfiltration wurde Sephadex-Gel verwendet (Pharmacia Uppsala).

Um die Trennfähigkeit der gewählten Gelmatrix zu zeigen, wurde bei vier Versuchen zum Albumin noch Gamma-Globulin hinzugefügt (Beriglobin, Behringwerke AG), das sich in Molekulargewicht und Molekülgröße deutlich vom Albumin unterscheidet.

Alle untersuchten Pharmaka ließen sich leicht im Solvens lösen, folgende Substanzen wurden mit wenig Natronlauge in Lösung gebracht: Acetazolamid, Acetylsalicylsäure, Chlortetracyclin, Indomethacin, Methotrexat, Phenylbutazon, Sulfadimethoxin.

b) Prinzip der Sephadex-Gelfiltration

Das Sephadex-Gel besteht aus wasserlöslichen Polysaccharidmolekülen, die mit Epichlorhydrin an den Hydroxylgruppen quervernetzt und dadurch unlöslich gemacht sind. Der Grad der Vernetzung ist beim Typ G-25 am größten und beim G-200 am geringsten. Die trockenen Körner der Handelsform quellen im wäßrigen Medium zu Kügelchen auf. Diese besitzen Poren, die nur die der Porengröße entsprechenden Moleküle aufnehmen und durch das Innere der Kügelchen wandern lassen. Die kleineren Moleküle müssen so einen längeren Weg zurücklegen als die größeren, welche den Raum zwischen den Gelpartikeln durchströmen. Kleinere Teilchen erscheinen also zeitlich später als größere im Eluat.

Abb. 3 veranschaulicht diesen Vorgang.

c) Entwicklung der Versuchsanordnung

Die orientierenden Versuche begannen mit Chromatographierohren, deren Durchmesser 12 mm betrug und die eine 30 - 50 cm hohe Gelpackung besaßen. Erprobt wurden die Geltypen G-75, 100, 150 und 200, stets unter Beobachtung der in der Gebrauchsanleitung gegebenen Vorschriften, die Quellzeit, Arbeitsdruck und Versuchsablauf betreffen. Die fortlaufend abgenommenen 2 - 3 ml Fraktionen des Eluats wurden refraktometrisch gemessen.

Es ging zunächst darum, die Größenverteilung (monomer-oligomer) der Albuminmoleküle in einer Elutionskurve sichtbar zu machen.

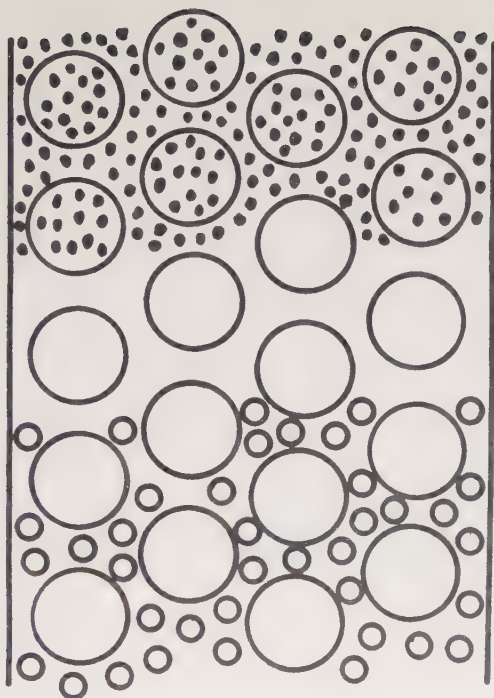


Abbildung 3

Prinzip der Gelfiltration mit Sephadex.

Die gequollenen Dextran-Kügelchen des Gels besitzen Poren definierter Größe. Trägt man eine wäßrige Lösung mit Molekülen unterschiedlicher Größe auf, so diffundieren die der Porengröße entsprechenden Moleküle in die Dextran-Kügelchen hinein. Sie haben so einen längeren Weg und benötigen mehr Zeit als die größeren Moleküle, die schneller den Raum zwischen den Kügelchen durchströmen können.

Zu jedem Versuch wurde frische Eiweißlösung verwandt: 1 g Rinderserumalbumin wurde in 25 ml Phosphatpuffer gelöst. Der so gewonnene Konzentrationswert von 4 g% kommt dem Albuminwert im Humanserum nahe. Später gingen wir dazu über, die Proteinlösung 24 Stunden vorher anzusetzen und bei + 4 Grad Celsius bis zum Versuch aufzubewahren, um eine Gleichgewichtseinstellung im Medium zu erreichen.

Die Meßergebnisse zeigten jedoch nur einen gleichmäßigen An- und Abstieg der Meßwerte. Auch die schrittweise erfolgende Verminderung des Probevolumens von 20 ml auf 0,5 ml änderte daran nichts. Um nun die Trennfähigkeit zu prüfen, enthielt eine Probe 3 g% Albumin und 1,6 g% Gamma-Globulin. Die zugehörigen Molekulargewichte, die in Relation zur Molekülgröße stehen, unterscheiden sich beträchtlich: Albumin monomer 67000, Albumin dimer 134000, Gamma-Globulin 140 - 150000.

Die Elutionskurve wies jedoch wiederum nur einen Ginfelwert auf, während bei der späteren endgültigen Versuchsanordnung drei deutliche Maxima zu finden waren (Abb. 4 und 5).

Daraufhin verlängerten wir die Packungshöhe des Gels auf 100 cm, verwendeten Sephadex G-100 und G-150 in jeweils zwei Säulen und trugen ein Probevolumen von 20 ml einer 4 g% Albuminlösung auf. Auch damit wurde keine Auftrennung in monomere und oligomere Moleküle sichtbar.

Zur zweiten Arbeitsperiode ließen wir Chromatographierohre von 25 mm innerem Durchmesser und einer Länge von 125 cm herstellen. Ein weiteres Rohr besaß 60 mm Innendurchmesser bei gleicher Länge. Sowohl die Geltypen G-100 wie G-200 wurden jeweils 100 cm hoch gepackt. Der Auslaufschlauch hatte immer einen Querschnitt von 1 mm.

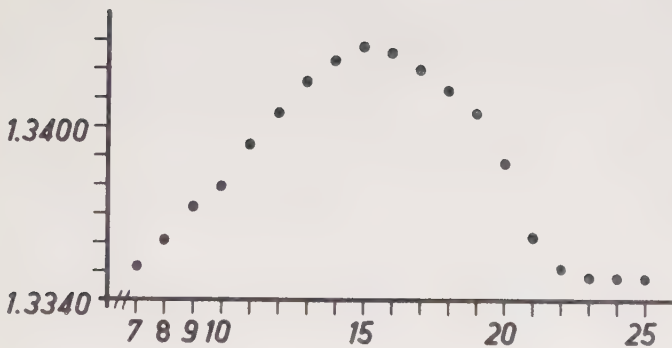


Abbildung 4

Gelfiltrationsversuch:

Refraktometrische Bestimmung der Eiweißkonzentration
in Fraktionen des Eluats.

Getestet wurden 10 ml einer Lösung von 3 g% Rinder-
albumin und 1,6 g% Gamma-Globulin.

Versuchsträger: Chromatographierohr 20 cm lang,
12 mm Durchmesser, Sephadex G-200

Ordinate: Brechungsindex

Abszisse: Zahl der Fraktionen (je 2 - 3 ml)

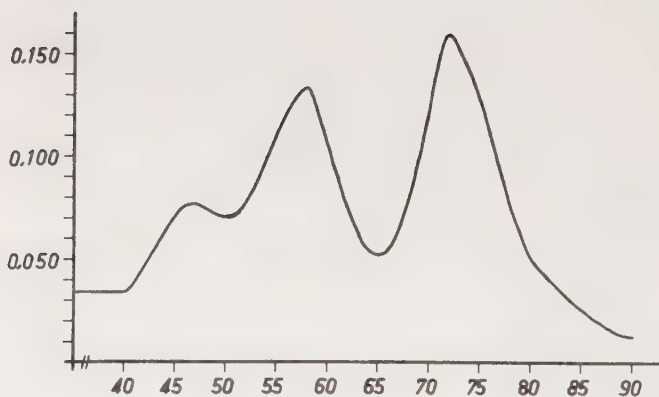


Abbildung 5

Gelfiltrationsversuch:

Photometrische Bestimmung der Eiweißkonzentration in
Fraktionen des Eluats nach Zugabe von Biuret-Reagenz.

Getestet wurden 2 ml einer Lösung von 4 g% Albumin
und 3,2 g% Gamma-Globulin.

Versuchsträger: Chromatographierohr 100 cm lang,
25 mm Durchmesser, Sephadex G 200

Ordinate: Extinktionsmeßwert

Abszisse: Zahl der Fraktionen

1 Fraktion = in 10 Minuten gesammeltes
Eluat

Bei einer Lösungsmenge von 2 - 5 ml (2 g% Albumin in Tris-Puffer) ließen sich zwei, manchmal sogar drei deutliche Maxima in der Elutionskurve darstellen. Auch größere Volumina (20 - 40 ml) zeigten zwei Gipfel in den Meßwerten.

Als am zuverlässigsten erwies sich eine Gelsäule von 100 cm Länge, 25 mm Dicke, mit G-200 gepackt. Die Extinktionen der aufgefangenen 2 - 3 ml Fraktionen des Eluates wurden mit dem Beckman-Spektrophotometer, Modell DB, bei einer Wellenlänge von 280 nm gegen aqua dest. gemessen (Diagramme siehe Abb. 6 und 7).

Die dritte Versuchsreihe wurde mit einem Durchfluß-UV-Monitor mit Schreiber der Firma Serva-Technik durchgeführt. Die Fraktionen sammelte in 10 Minuten-Intervallen das Gerät Linear II derselben Firma. In dieser UV-Meßkurve wurden bei jedem Versuch zwei Gipfel der Extinktionsmeßwerte aufgezeichnet. Als endgültige Versuchsanordnung stand nun fest:

Sephadex G-200, Säulenhöhe 100 cm, Durchmesser 25 mm, Arbeitsdruck 12 cm Wassersäule, Auslaufschlauch 1 mm Querschnitt. Eine Probenmenge von 2 ml brachte die besten Ergebnisse und war gut zu handhaben, eine Erhöhung auf bis zu 40 ml ergab keine Vorteile. Ebenso fand sich keine Änderung des Kurvenbildes bei pH 6,0 und pH 8,0 gegenüber der bisher benutzten Einstellung der Lösung auf pH 7,40. Dieser Wert entspricht dem des menschlichen Blutes.

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde nun in spezifischer Weise bestimmt. Dazu wurde 1 ml der jeweiligen Fraktion mit 4 ml Biuret-Reagenz gemischt. Ein Eppendorf-Photometer M 1101 gab bei 546 nm die Extinktion der Probe gegen aqua dest. an.

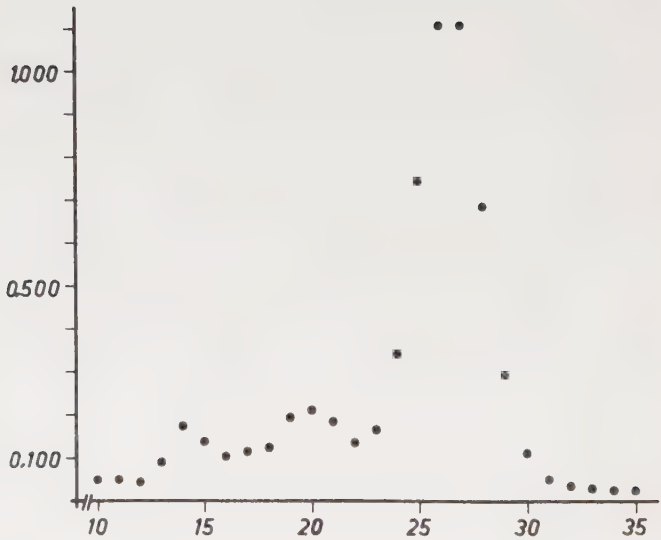


Abbildung 6

Photometrische Bestimmung der Eiweißkonzentration
in Fraktionen des Eluats.

Getestet wurden 2 ml 2 g% Albuminlösung.

Versuchsträger: Chromatographierohr 100 cm lang,
25 mm Durchmesser, Sephadex G-100.

Ordinate: Extinktionsmeßwert

Abszisse: Zahl der Fraktionen

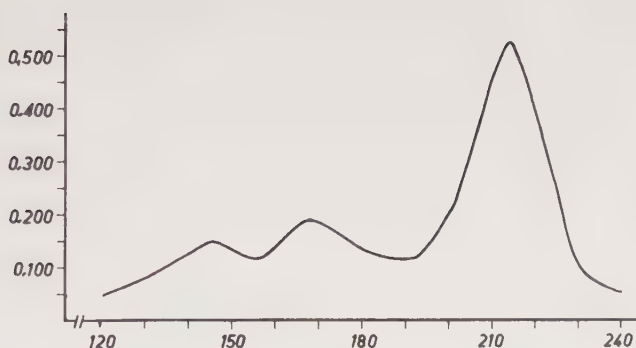


Abbildung 7

Photometrische Bestimmung der Eiweißkonzentration
in Fraktionen des Eluats.

Getestet wurden 5 ml 2 g% Albuminlösung.

Versuchsträger: Chromatographierohr 100 cm lang,
25 mm Durchmesser, Sephadex G-200.

Ordinate: Extinktionsmeßwert

Abszisse: Zahl der Fraktionen

Aus zwei Gründen erhöhten wir die Albuminkonzentration auf 10 g%:

- 1) der Anteil an ungebundenem Arzneimittel sollte möglichst klein bleiben (Franz et al., 1969),
- 2) da im Eluat eine Verdünnung der Ausgangskonzentration von 1:10 gemessen wurde, mußte der Anfangswert hoch liegen, um kleine Konzentrationsunterschiede in den Fraktionen sichtbar machen zu können.

Um bei der Auswertung der Elutionskurven von zufälligen Konzentrationsschwankungen unabhängig zu sein und um einen Bewertungsbegriff zu haben, errechneten wir jeweils den Quotienten aus dem Extinktionswert des größeren Gipfels geteilt durch den des kleineren.

d) Einfluß von Pharmaka auf die Aggregation von Albuminmolekülen: Ablauf eines Versuchs.

Je ein Kontrollversuch mit einer 10 g%igen Albuminlösung und ein Pharmakonversuch, bei welchem der Eiweißlösung noch ein Arzneimittel in 10^{-3} M Konzentration zugesetzt ist, laufen parallel.

Zwei Chromatographierohre mit je einem Fraktions-sammler stehen zur Verfügung, während zwei weitere Säulen für den nächsten Versuch vorbereitet werden. Denn Pufferlösung und Arzneimittel eluieren zwei Tage lang vor, um ein gleichmäßiges Milieu zu erhalten. Der pH-Wert der Probe, die Albumin bzw. Albumin mit Pharmakon und Tris-Puffer enthält, wird potentiometrisch auf 7,40 eingestellt. Jeder Versuch läuft bei Zimmertemperatur ab (Abb. 8 und 9).

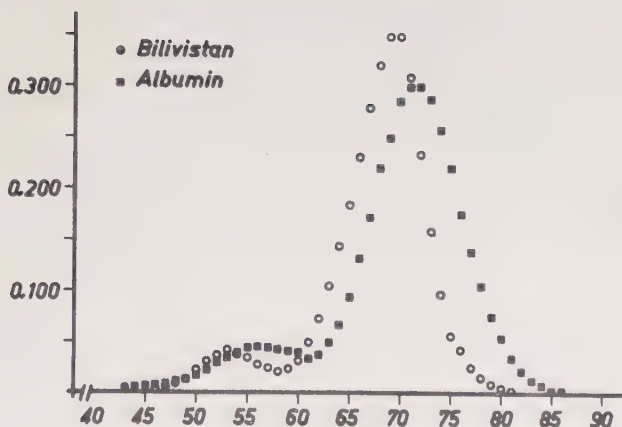


Abbildung 8

Photometrische Bestimmung der Eiweißkonzentration
in Fraktionen des Eluates nach Zugabe von Biuret-Reagenz

Aufgetragen wurden einer 100 cm langen, 25 mm dicken
Sephadex G-200 Säule

a) 2 ml einer 10 g% Albuminlösung

b) 2 ml einer 10 g% Albuminlösung, der Ioglycamid
(Bilivistan^R) in 10^{-3} M Konzentration beigegeben
war.

Ordinate: Extinktionsmeßwert

Abszisse: Zahl der Fraktionen

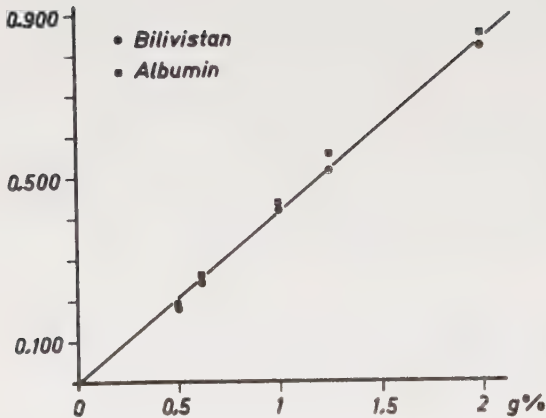


Abbildung 9

Photometrische Bestimmung der Eiweißkonzentration nach Zugabe von Biuret-Reagenz.

Eichkurven

- Rinderserumalbuminlösung 10 g%
- 10 g% RSA-Lösung mit 10^{-3} M Ioglycamid (Bilivistan R)

Ordinate: Extinktionsmeßwert

Abszisse: Eiweißkonzentration in g%

Ergebnisse

Reihe I: Orientierende Versuche

In der ersten Versuchsreihe wurden verschiedene Pharmaka getestet. Dabei wurden zwei bis vier Versuche für jedes Pharmakon durchgeführt. Als Kontrollwerte dienten die Albuminwerte von fünf Versuchen ohne Arzneimittel. Der Wert für den Quotienten ist für die Einzelversuche in Tab. 1 wiedergegeben, die entsprechenden Mittelwerte, Varianzen und Standardabweichungen in Tab. 3.

Ioglycamid, Methotrexat, Phenylbutazon und Suramin zeigten in dieser ersten Versuchsreihe bezüglich des Quotienten den größten Unterschied zur Eiweißkontrolle und wurden deshalb in einer zweiten Versuchsreihe nochmals geprüft.

Reihe II: Versuche mit vier ausgewählten Pharmaka

Bei dieser Reihe wurden mit den oben genannten Pharmaka Paralleluntersuchungen durchgeführt. Gleichzeitig wurde eine Säule mit Albuminlösung beschickt, während die Probemenge der zweiten Säule zusätzlich ein Pharmakon enthielt. Die äußeren Einflüsse waren somit für beide Säulen gleich. Die Werte für die Einzelversuche sind in Tab. 2 aufgeführt, während die zugehörigen Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardabweichungen des Mittelwertes in Tab. 4 gebracht werden.

Tabelle 1

Orientierende Versuche mit verschiedenen Pharmaka. Angegeben sind die ermittelten Quotienten aus den beiden Extinktionsmaxima. Die Konzentration der Pharmaka beträgt 10^{-3} M, nur bei Suramin 10^{-4} M. Die angegebenen Werte stellen Einzelwerte dar.

Substanz	Quotient				
Kontrolle	6,05	6,41	6,66	5,74	6,43
Acetazolamid	6,51	6,47	7,04	7,60	
Acetylsalicylsäure	5,02	5,66	5,70	6,41	
Chlortetracyclin	6,40	6,35	6,85	6,46	
Dicloxacillin	7,03	7,04	7,39	7,64	
Indomethacin	6,64	6,59	5,94		
Ioglycamid	5,90	8,30	7,64	7,85	
Methotrexat	7,43	7,53	7,12	8,33	
Phenprocoumon	5,83	6,16			
Phenylbutazon	7,63	7,64			
Sulfadimethoxin	5,16	5,47	5,65	6,35	
Suramin	6,48	6,65	7,05	7,05	

Tabelle 2

Parallelversuche mit vier ausgewählten Pharmaka.

Säule 1: Albumin

Säule 2: Albumin und Pharmakon

Angegeben sind die Versuchsnummer und der Quotient aus den beiden Extinktionsmaxima für die untersuchte Substanz.

Versuchs- nummer	Albumin	Metho- trexat	Phenyl- butazon	Iogly- camid	Suramin
87	6,89	7,92			
89	8,00	7,25			
90	-	8,36			
91	9,04	9,15			
92	5,92	5,84			
93	6,15	6,43			
94	7,75		5,89		
95	6,93	6,57			
96	8,33	8,39			
97	8,06	8,03			
98	8,37		7,61		
99	-		7,30		
102	6,69			8,00	
103	4,55			8,29	
104	5,45			6,00	
105	4,16			6,21	
106	4,75			8,63	
108	-				6,31
109	5,97				4,40
110	4,72				6,11
111	7,06				6,09
112	6,36				6,60
113	6,75			6,23	
114	7,03			8,69	
115	9,83			8,61	

Statistik Reihe I

Eine einfache Varianzanalyse wurde für die Mittelwerte des Quotienten zwischen den Pharmaka einschließlich der "Kontrolle" vorgenommen. Die Tabelle 3 gibt die Ergebnisse wieder. Dieser Test stellt global einen signifikanten Unterschied der Quotienten aus den Extinktionsmaxima für die einzelnen Substanzen fest. Der errechnete F-Wert überschreitet den tabellierten F-Wert bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 1\%$. Anschließend wurden lineare Kontraste zwischen Kontrolle und je einem Pharmakon mittels Scheffé-Test geprüft. Keiner dieser Kontraste brachte ein signifikantes Ergebnis.

Statistik Reihe II

Der erste Schritt war die Bestimmung von Mittelwert, Standardabweichung und Standardabweichung des Mittelwertes für den Quotienten aus dem 2. und 1. Extinktionsmaximum der getesteten Substanz für sämtliche Versuchsnummern (Tabelle 4).

Der zweite Schritt galt der Prüfung der Frage, ob der Mittelwert des Quotienten für ein Pharmakon gleich dem Mittelwert der Kontrolle ist. Die Prüfung erfolgte mit Hilfe des Student'schen t-Testes, wobei für die Kontrollgruppe nur die vorhandenen Werte der Parallelgruppe hinzugezogen wurden.

Es wurde die Nullhypothese

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

gegen die Alternativhypothese
geprüft.

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse des t-Testes wiedergegeben.

Tabelle 3

Varianzanalyse

Vergleich der Quotienten aus den Extinktionsmaxima.

Untersucht wird, ob sich die Quotienten der einzelnen Substanzen signifikant unterscheiden.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der jeweiligen Quotienten.

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

FG = Freiheitsgrad

MAQ = mittleres Abweichungsquadrat

F = errechneter F-Wert

Substanz	Mittelwert	Standard- abweichung
Albumin	6,27	0,37
Acetazolamid	6,91	0,54
Acetylsalicylsäure	5,78	0,47
Chlortetracyclin	6,49	0,26
Dicloxacillin	7,28	0,30
Indomethacin	6,40	0,39
Ioglycamid	7,44	1,06
Methotrexat	7,61	0,52
Iphenprocoumon	6,00	0,24
Phenylbutazon	7,64	0,01
Sulfadimethoxin	5,67	0,50
Suramin	6,82	0,29

Varianz	SAQ	FG	MAQ
zwischen	18,89	11	1,72
innerhalb	7,99	32	0,25
total	26,87	43	

Signifikanztest der Quotientenunterschiede:

F = 6,88

Signifikanter Unterschied

($F(\alpha = 1\% : 11,32) = 2,86$)

Tabelle 4

Nachfolgend sind die Mittelwerte des Quotienten für die einzelnen Pharmaka aufgeführt, dabei wurden die Albuminwerte sämtlicher Versuchsnummern zusammengefaßt.

Angegeben sind Substanz, Anzahl der Versuche n , Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s , Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ des Quotienten.

	n	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
Albumin	22	6,77	1,51	0,32
Methotrexat	9	7,55	1,10	0,37
Phenylbutazon	3	6,94	0,92	0,53
Ioglycamid	8	7,59	1,22	0,43
Suramin	5	5,90	0,87	0,39

Tabelle 5

Versuche mit vier ausgewählten Pharmaka gegen eine parallel laufende Kontrolluntersuchung.

Auswertung der Quotienten aus den Extinktionsmaxima.
Student'scher t-Test: Vergleich der Quotienten der Eiweiß-Kontrollgruppe versus Pharmakongruppe.

Angegeben sind Anzahl der Versuche n, Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s und der t-Wert.

	n	$\bar{x}$	s	t-Wert
Albumin	8	7,42	1,11	- 0,25
Methotrexat	9	7,55	1,10	
Albumin	2	8,06	0,44	1,57
Phenylbutazon	3	6,94	0,92	
Albumin	8	6,16	1,85	- 1,84
Ioglycamid	8	7,59	1,22	
Albumin	4	6,03	0,99	0,21
Suramin	5	5,90	0,87	

Die t-Werte sind nicht signifikant auf dem 5 % Niveau der Irrtumswahrscheinlichkeit.

(Bei Ioglycamid müßte zur Signifikanz ein t-Wert von - 2,145 unterschritten werden.)

Diskussion

Diese Arbeit hatte zum Ziel, mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration die Größenverteilung der Moleküle in einer Rinderserumalbumin-Lösung sichtbar zu machen, und so das Gleichgewicht zwischen mono- und oligomeren Bestandteilen der Lösung zu zeigen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob verschiedene Pharmaka einen Einfluß auf dieses Gleichgewicht ausüben können.

Strukturbedingt bietet das monomere Proteinmolekül mehr Bindungsstellen für den Fremdstoff an als das oligomere, das Bindungsstellen zur Aggregation selbst benötigt. Wenn also möglichst viel Albumin in einer Lösung zur Aggregation gebracht wird, bleiben weniger Bindungsstellen für Fremdstoffe übrig.

Es wurde eine Versuchsanordnung entwickelt, die in ihrer Elutionskurve wenigstens zwei deutliche Maxima aufwies (siehe Kurvendigramme). Außer diesen Maxima zeigt die Kurve zu Beginn Unregelmäßigkeiten, die sowohl durch Streuung als auch durch oligomere Bestandteile hervorgerufen sein könnten. Das erste deutlich ausgeprägte Maximum gibt nach dem Prinzip der Gelfiltration die dimeren Albuminmoleküle wieder, während das zweite, höhere die monomeren Moleküle beinhaltet.

Ein relativ zuverlässiges Kriterium zur Auswertung eines Versuches schien der Quotient aus den Gipfel-Extinktionswerten des zweiten und ersten Kurvenmaximums zu sein.

Die erreichten Extinktionswerte selbst sind Schwankungen ausgesetzt, die sich aus der Empfindlichkeit der Gelmatrix gegenüber äußeren Einflüssen ergeben (insbesondere Änderungen der Elutionsgeschwindigkeit).

Die statistische Analyse der ersten Versuchsreihe, in der Eiweiß und verschiedene Pharmaka getestet wurden, sagt allgemein aus, daß sich die Quotienten der Arzneimittel und des Albumins signifikant unterscheiden. Dieser Test zeigt global, daß die Zugabe eines Pharmakons das Gleichgewicht der Lösung beeinflußt hat, jedoch zeigte das einzelne Pharmakon gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied.

Um die gleichen äußeren Einflüsse für Kontroll- und Pharmakonversuch zu erhalten, wurden Parallelversuche durchgeführt. Der jeweils angewandte t-Test erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Pharmakon.

Die Versuchsergebnisse zeigten eine relativ große Streuung, die nur durch eine erheblich größere Zahl von Versuchen hätte eingeengt werden können. Da aus technischen Gründen immer nur zwei Säulen getestet werden konnten, wäre^{ein} sehr viel größerer Zeitraum erforderlich gewesen. Weitere Schwierigkeiten lagen in der diffizilen Handhabung der hohen Gelsäulen. Das sehr druckempfindliche Sephadex G-200 ließ nur wenige Versuche zu, wobei das Nachlassen guter Filterwirkung allmählich geschah.

Zusammenfassung

Es wurde ein Weg gesucht, in einer Rinderserumalbumin-Lösung die Größenverteilung der Albuminmoleküle sichtbar zu machen. Mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration (Typ G-200) wurde ein Elutionsdiagramm gewonnen, das wenigstens zwei deutliche Kurvenmaxima zeigt.

Als Versuchsträger dienten Chromatographierohre von 100 cm Länge und 25 mm Durchmesser. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler aufgefangen, mit Biuret-Reagenz versetzt und photometrisch gemessen. Die Elutionskurve gibt die molekulare Größenverteilung der Lösung wieder. Die monomeren Albuminmoleküle überwiegen gegenüber den oligomeren.

Weiterhin wurde der Einfluß elf verschiedener Pharmaka auf die Aggregation der Albuminmoleküle geprüft. Eine Beeinflussung des Aggregationsverhaltens durch Zugabe eines Pharmakon konnte nicht signifikant ermittelt werden.

Literaturverzeichnis

ANTON, H.H.:

A drug induced change in the distribution
and renal excretion of sulfonamides.

J. Pharmacol. exp. Ther. 134, 291-303 (1961)

BENNHOLD, H.: in H. Bennhold, E. Kylin, S. Rusznyak

Die Eiweißkörper des Blutplasmas.

Die Vehikelfunktion der Bluteiweißkörper.

Leipzig: Steinkopff 1938

BONNYCASTLE, D.D.: in Drill's Pharmacol. in Medicine

Intimate Study of Drug Action I:

Absorption and Distribution.

New York: McGraw-Hill 1965

BRODIE, B.B.: in (T.B. Binns, Ed.)

Absorption and Distribution of Drugs.

Edinburgh: Livingstone 1964

BRODIE, B.B.:

Displacement of one drug by another
from carrier or receptor sites.

Proc. Roy. Soc. Med. 58, 946-955 (1965)

DAVIS, B.D. and W.B. WOOD:

Studies on antibacterial action
of sulfonamide drugs.

III. Correlation of drug activity
with binding to plasma proteins.

Proc. Soc. exp. Biol. N.Y., 51, 283-285 (1942)

DAVIS, B.D.:

The binding of sulfonamide drugs by
plasmaproteins. A factor in determining
the distribution of drugs in the body.
J. clin. Invest. 22, 753-762 (1943)

DEWEY, H.M. and A. Wormall:

Studies on Suramin (antrypol: Bayer 205)
5. The combination of the drug with the
plasma and other proteins.
Biochem. J. 40, 119-124 (1946)

DIXON, R.L., E.S. Henderson and D.L. Rall:

Plasmaproteinbinding of methotrexate
and its displacement by various drugs.
Fed. Proc. 24, 454 (1965)

FOSTER, J.F.:

Plasma Albumin. In: The Plasma Proteins,
Vol. I., ed. F.W. Putnam, pp. 179-239
London-New York: Academic Press 1960

FRANZ, J.W., E. Jähnchen, J. Krieglstein:

Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf
das Bindungsvermögen einer Albuminlösung
für Promazin und Chlorpromazin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 264,
462-475 (1969)

FRANZ, J. .:

Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf
die Bindung von Promazin an Rinderserum-
albumin.
Inaugural Dissertation Mainz 1970

GEIGY, J.R., AG:

Pharmazeutische Abteilung: Documenta Geigy,
wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl. Basel 1960

GOLDSTEIN, A.:

The interaction of drugs and plasmaproteins.
Pharmacol. Rev. 1, 102-165 (1949)

JÄHNCHEN, E., J. Krieglstein, G. Kuschinsky:

Über den Einfluß saurer Substanzen auf die
Bindung von Promazin an Rinderserumalbumin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.
260, 147 (1968)

KLOTZ, J.M. and J. Ayers:

Protein interaction with organic molecules.
Discuss. Faraday Soc. 13, 189-196 (1953)

KLOTZ, J.M., R.K. Burkhard, J.M. Urquart:

Structural specificities in the interactions
of some organic ions with serum albumin.
J. Amer. chem. Soc. 74, 202-208 (1952)

KRIEGLSTEIN, J.:

Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.
Klin. Wochenschrift 47, 1125-1130 (1969)

KRIEGLSTEIN, J., J.W. Franz und E. Jähnchen:

Zunahme der Promazin-Albumin-Bindung
bedingt durch andere Pharmaka.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.
264, 261 (1969)

KUNIN, C.M.:

Inhibitors of penicillin binding
to serumproteins.
J. Lab. Clin. Med. 65, 416-431 (1965)

KUNIN, C.M. and M. Finland:

Restrictions imposed on antibiotic therapy
by renal failure.
A.M.A. Arch. intern. Med. 104, 1030-1050 (1959)

RIEGERICH, R.:

Klinische Chemie. Biuret Methode.
Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt 1968

SCHOLTAN, W.:

Die Bindung der Langzeitsulfonamide an die
Eiweißkörper des Serums. 2. Mitteilung
Arzneimittel-Forsch. 11, 707-720 (1961)

SCHOLTAN, W.:

Bestimmungsmethoden und Gesetzmäßigkeiten
der Eiweißbindung von Sulfonamiden und
Penicillinen.
Chemotherapie 12, 103-134 (1964 a)

SCHOLTAN, W.:

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
3. Mitteilung: Sulfonamid-Bindungsvermögen
und optisches Drehungsvermögen der Serum-
eweißkörper.
Arzneimittel-Forsch. 14, 1234-1238 (1964 b)

SCHOLTAN, W., C. Gloxhuber:

Die Eiweißbindung von Bilirubin und Bromsulfalein.

Arzneimittel-Forsch. 16, 520-528, (1966)

UNGLER, H.:

Gegenseitige Beeinflussung von Arzneimitteln.

In: Kuemmerle, Garrett, Spitzzy: Klinische
Pharmakologie und Pharmakotherapie,

München und Berlin: Urban & Schwarzenberg 1971

Lebenslauf

Am 19.10.1945 wurde ich als vierter Sohn des kath. Kaufmanns Wilhelm Dopjans und seiner Ehefrau Wilma geb. Listemann in Osnabrück geboren.

Von Ostern 1952 bis Ostern 1956 besuchte ich die Volksschule Hellern bei Osnabrück, anschließend das humanistische Gymnasium Carolinum zu Osnabrück, an dem ich im Februar 1965 das Abitur bestand.

Nach 18 Monaten Wehrdienst begann ich im Herbst 1966 das Studium der Zahnheilkunde, das ich nach zehn Semestern im Herbst 1971 mit dem Staatsexamen abschloß.

Am 22.1.1972 heiratete ich Fräulein Gertrud Ochsenreither, die die Laufbahn einer Real-
schullehrerin eingeschlagen hat.

Seit dem 1.4.1972 bin ich bei dem Zahnarzt Dr. Klaus Mayer in Konz bei Trier als Assistent tätig.

